

Rec'd PCT/PTA 24 JUN 2004

PCT/EP 02 / 1 4 7 2 7

MODULARIO
LOA - 101



Mod. C.E. - 1-4-7

REC'D 20 MAR 2003

WIPO PCT

10/500270

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Ufficio G2



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**

N.

RM2001 A 000767

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma 18 DIC. 2002...



IL DIRIGENTE

Elena Marinelli
Sig.ra E. MARINELLI

3141PTIT

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA

MODULO A

marca
da
bollo

PUBBLICO

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione **Corrado SPADAFORA**Residenza **Roma**2) Denominazione **Rodolfo Nello LORENZINI**

Residenza

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

segretario nome **Dr.ssa Maria Vittoria Primiceri ed altri**

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza **NOTARBARTOLO & GERVASI SpA**via **Davolia**n. **82**città **Roma**cap **00198**(prov) **RM**

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via **Come sopra**n. **1**

città

cap

(prov) **1**

D. TITOLO

classe proposta (sez/ci/sci)

gruppo/sottogruppo

Uso di 5.11-diidro-6H-dipirido[3,2-b:2',3'-e][1,4] diazepine per la preparazione di composizioni farmaceutiche antitumorali.

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

E. INVENTORI DESIGNATI

segretario nome

cognome nome

1) **SPADAFORA Corrado**

3)

2) **LORENZINI Rodolfo Nello**

4)

F. PRIORITÀ

nazione e organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/P

SGIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

1) **Nessuna**

2)

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI, designazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

Nessuna

10,33 Euro

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. di

Doc. 1) **4**

PROV

n. pag.

09Doc. 2) **3**

PROV

n. pag.

01Doc. 3) **1**

RIS

Doc. 4) **1**

RIS

Doc. 5) **1**

RIS

Doc. 6) **1**

RIS

Doc. 7) **1**

RIS

riassunto con disegno principale, riassunto e rivendicazione (obbligatorio 1 esemplare)

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale

designazione inventore

documenti di priorità con traduzione in italiano

autorizzazione a atto di cessione

nominativo completo del richiedente

Trecentoquindicimila

B) attestato di versamento, totale lire

COMPILATO IL **24/12/2001**

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I)

Dr.ssa Maria Vittoria Primiceri

obbligatorio

CONTINUA SI/NO **SI/NO**DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO **SI**XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX **RM 2001 A 000767** C.C.I.A.A. Roma codice **158**

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

Reg.A

L'anno millesimato

Duemilauno

il giorno

Ventiquattro

del mese di

DicembreIl(I) richiedente(i) sopra indicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. **100** fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraripartito.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

Paolo Colaninno

Umbro

L'UFFICIALE ROGANTE
L'Ufficiale Rogante

3141PTIT

PROSPETTO A

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE

NUMERO DOMANDA

REG. A

DATA DI DEPOSITO

24 12 2001

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

A. RICHIEDENTE (I)

Denominazione

Residenza

RM 2001 A 000767

D. TITOLO

Uso di 5,11-diidro-6H-dipirido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepine per la preparazione di composizioni farmaceutiche antitumorali.

Classe proposta (sez./cl./scl.)

(gruppo/sottogruppo)

L. RIASSUNTO

La presente invenzione si riferisce all'uso di 5,11-diidro-6H-dipirido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepine, e in particolare della nevirapina nella preparazione di composizioni farmaceutiche antitumorali.



M. DISEGNO

RM 2001 A 000767

Descrizione della Domanda di Brevetto per Invenzione dal titolo:

Uso di 5,11-diidro-6H-dipirido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepine per la preparazione di composizioni farmaceutiche antitumorali.

A nome di: Corrado SPADAFORA e Rodolfo Nello LORENZINI

Entrambi con sede in: ROMA

Inventori designati: Corrado SPADAFORA, Rodolfo Nello LORENZINI

depositata il con il N°

Campo dell'invenzione

La presente invenzione si riferisce all'uso di 5,11-diidro-6H-dipirido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepine, e in particolare della nevirapina per la preparazione di composizioni farmaceutiche antitumorali.

Stato dell'arte

I composti denominati 5,11-diidro-6H-dipirido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepine sono noti e descritti in EP 429.987. Essi sono impiegati nella prevenzione e trattamento delle infezioni da HIV. Rientra in questi composti la nevirapina (5,11-diidro-11-ciclopropil-4-metil-6H-dipirido-[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepin-6-one), nota anche con il termine commerciale di VIRAMUNE®. Essa ha la seguente formula bruta $C_{15}H_{14}N_4O$, allo stato puro è un solido cristallino di peso molecolare 266,302, con intervallo di fusione 247-249°C e solubilità 0,1 mg/ml in acqua e 5,5 mg/ml in etanolo e può essere preparata secondo le indicazioni presenti nel brevetto EP 429.987.

La nevirapina è nota come inibitore nucleosidico della trascrittasi inversa (RT) altamente specifico per il virus HIV-1 e come tale è utilizzata in commercio.

Relativamente alla trascrittasi Inversa (RT) essa è un enzima endogeno.

codificato da due classi di elementi ripetuti, ubiquitariamente presenti nei genomi eucariotici: i retrotransposoni ed i retrovirus endogeni. L'espressione dei geni codificanti RT, mentre è repressa nelle cellule terminalmente differenziate *non patologiche*, è al contrario attiva nelle cellule germinali, embrionali e nei tumori. Il potenziale ruolo della RT nei processi biologici fondamentali non è mai stato chiarito.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

E' stato ora trovato che la RT endogena ha un ruolo nel processo di trasformazione tumorale e, conseguentemente, nel controllo della proliferazione cellulare. Sono pertanto oggetto della presente invenzione i composti che mostrano attività di inibizione della RT e che quindi possono essere utilizzati come farmaci antiproliferativi. In particolare l'invenzione si riferisce esplicitamente ai composti descritti in EP 429.987 (qui incorporato per riferimento) e denominati 5,11-diidro-6H-dipirido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepine, alle relative forme farmaceutiche e dosaggi descritti.

Le diazepine sopra citate, e la nevirapina come esempio particolare, nelle loro forme farmaceutiche già abitualmente usate e commercialmente disponibili, si *propongono come esempio di sostanze utili per la preparazione di composizioni* farmaceutiche utilizzabili nei casi in cui si debba controllare la proliferazione cellulare, quindi con azione antitumorale. L'efficacia antitumorale delle molecole è da porre in relazione alla loro capacità inibitoria della RT.

Per determinare l'attività antitumorale della nevirapina (nota commercialmente come VIRAMUNE®) cellule F9 di teratocarcinoma murino sono state poste in coltura con 350 µM di nevirapina ed è stato trovato che questa molecola causa un totale ed irreversibile arresto della proliferazione delle F9. Inoltre, le F9

trattate vanno incontro ad un processo di differenziazione che converte il loro fenotipo morfologico da tipicamente tumorale a differenziato, simile a quello normale. Saggi in vitro basati su analisi PCR utilizzando estratti cell-free, hanno dimostrato la presenza di un'attività RT in queste cellule che è inibita dalla nevirapina in modo dose-dipendente. L'analisi per RT-PCR di campioni di RNA estratti da cellule trattate con nevirapina e da cellule controllo ha dimostrato che l'esposizione alla molecola silenzia l'espressione dei geni Ciclina D1 e Ciclina D2 marcatori genici delle cellule in proliferazione.

Nel loro insieme, questi risultati suggeriscono che una attività di RT endogena è coinvolta nel processo di cancerogenesi e che la nevirapina, interferendo con l'attività RT, è in grado di arrestare la progressione tumorale delle cellule e di riconvertire le cellule trasformate in cellule fenotipicamente normali.

Gli esempi seguenti, unitamente alle figure allegate, vengono dati al solo scopo di illustrare l'invenzione e non sono da considerare come limitativi della portata della medesima.

Parte sperimentale MATERIALI E METODI

Esempio 1 - Colture cellulari ed incubazione con nevirapina

Le cellule F9 sono coltivate in D-MEM con 10% siero fetale. Le cellule sono piastrate ad una densità di circa 20.000, lasciate aderire alla piastra per 3-6 ore e quindi il terreno è sostituito con altro terreno fresco contenente nevirapina alla concentrazione di 350 μ M. Campioni di cellule sono prelevati a 48, 72, 96 e 120 ore di incubazione ed utilizzate per le analisi. Da ogni prelievo si recuperano le cellule morte dal supernatante, mentre quelle vive vengono staccate dalla piastra per tripsinizzazione.

Esempio 2 - Preparazione del lisato cellulare e test in vitro per RT

Le cellule sono raccolte dal terreno di coltura, contate e lavate due volte con PBS. Il pellet cellulare è risospeso nel rapporto di $20 \mu\text{l}/10^6$ cellule, in un tampone di lisi costituito da: Tris-HCl 10 mM pH 7,4, MgCl₂ 1mM, EGTA 1mM, PMSF 0,1 mM, β -mercaptoetanol 5 mM, CHAPS 0,5% e Glicerolo 10%. Si incuba per 30 min in ghiaccio, si centrifuga per 30 min a 4°C e si preleva il supernatante. Il test di retrotrascrizione di routine è fatto mescolando per ogni reazione un volume del supernatante corrispondente a 10 ng di proteine, 20 ng RNA MS2, i 4 deossinucleotidi (dNTP) 200 μM ognuno, una coppia di oligonucleotidi specifici per l'MS2, tampone 1X per la RT/Taq polimerasi ed infine 0,2 unità di Taq polimerasi. Si incuba per 40 min a 50°C; quindi per 2 min a 95°C e poi si amplifica con 30 cicli di PCR il prodotto di retrotrascrizione MS2.



Esempio 3 - Estrazione dell'RNA

L'RNA è estratto sia dalle cellule che dal fegato utilizzando il kit commerciale di estrazione "Rneasy Protect Starter Kit" (Qiagen) e seguendo le istruzioni raccomandate dalla casa produttrice.

DESCRIZIONE DEI RISULTATI

Rallentamento dell'attività proliferativa e differenziamento delle cellule F9 indotti dalla nevirapina

Culture cellulari di F9 sono incubate con nevirapina alla concentrazione di 350 μM , in parallelo ad altre di controllo cresciute in assenza della molecola. Aliquote di cellule sono prelevate a 48 e 72 ore dell'inseminazione da entrambe le popolazioni ed utilizzate per valutare la proliferazione cellulare. I risultati riassunti nella Figura 1 dimostrano come la crescita cellulare, iniziata con un egual numero di cellule (20.000) in entrambe le colture, sia fortemente inibita

dalla nevirapina in paragone alle cellule di controllo.

Per valutare se l'inibizione è strettamente legata alla continua presenza della molecola o se l'effetto inibitorio è permanente anche dopo la sua rimozione, aliquote di cellule controllo e preincubate con nevirapina, entrambe cresciute per 120 ore, sono lavate e riinseminate in assenza di nevirapina per ulteriori 48 ore. I risultati della Figura 2 indicano chiaramente che l'inibizione della proliferazione è permanente nelle cellule preincubate con nevirapina, al contrario dei controlli la cui proliferazione è ripresa normalmente.

La caratterizzazione morfologica delle cellule per microscopia a contrasto di fase è stata effettuata comparativamente su cellule F9 controllo, cellule differenziate in vitro con Acido Retinoico (RA) e cellule trattate con nevirapina. I risultati riassunti nella Figura 3 dimostrano che nelle cellule trattate con nevirapina (NEV) è in corso un processo di differenziamento che le rende simili alle cellule differenziate con Acido Retinoico (RA) e morfologicamente diverse dalle cellule F9 di controllo (ctr), che mostrano il fenotipo tipico delle cellule tumorali embrionali.

Attività di trascrittasi Inversa endogena in cellule F9, sensibile alla nevirapina

La presenza dell'attività RT, l'enzima target della nevirapina, è stata dimostrata nelle cellule F9 utilizzando un test *in vitro* cell-free. Cellule F9 sono state raccolte dai terreni di coltura, omogenate e l'omogenato centrifugato per rimuovere i frammenti cellulari. Il supernatante è stato utilizzato per il test. Aliquote del supernatante sono state incubate con l'RNA fagico MS2 (commercialmente disponibile) e quindi amplificate per PCR diretta usando una coppia di oligonucleotidi specifica per l'MS2. In parallelo, aliquote del supernatante cellulare sono state incubate con l'RNA MS2 in presenza di

quantità crescenti di nevirapina.

Le amplificazioni per PCR diretta rilevano la presenza di DNA complementare (cDNA) di MS2 copiato sullo stampo dell'RNA MS2: qualora questa reazione avvenisse, sarebbe una prova della presenza della RT nell'estratto cellulare F9. La Figura 4 riassume i risultati delle amplificazioni: il cDNA MS2 è in effetti sintetizzato nell'estratto cellulare F9 (corsia F9) come dimostrato dall'amplificazione positiva ed è inoltre inibito dalla nevirapina in modo dose-dipendente a 100 μ M, ma non a 1 e 10 μ M.

Questi risultati dimostrano un'attività di RT endogena nelle F9 che è efficacemente inibita dalla nevirapina ad una concentrazione simile a quella a cui sono state incubate le cellule.

Silenziamento dei geni Cyclina D1 e D2 in cellule F9 bloccate con nevirapina

Allo scopo di chiarire il meccanismo molecolare attraverso il quale la nevirapina induce l'arresto della proliferazione cellulare, abbiamo analizzato in modo comparativo l'espressione di alcuni geni rilevanti nel controllo di ciclo cellulare in cellule F9 controllo e bloccate con nevirapina. Come ulteriore controllo si è utilizzato il fegato di topo.

RNA è stato estratto da entrambe le popolazioni cellulari e dal fegato ed analizzato per RT-PCR usando per le amplificazioni coppie di oligonucleotidi specifici per i geni: Cyclina D1, Cyclina D2, Bcl2, p27 e Actina, quest'ultimo considerato come gene controllo costitutivamente espresso. I risultati, riassunti nella Figura 5, dimostrano come i cinque geni siano espressi sia nelle cellule F9 controllo (CTR) che nel fegato (Feg) mentre l'espressione dei geni delle Cicline D1 e D2 sia silenziata nelle cellule trattate con nevirapina (NEV).

Questi risultati suggeriscono che l'espressione di alcuni geni (Cicline D1 e D2)

LLP

implicati nella modulazione del ciclo cellulare siano sotto il controllo della RT endogena e che pertanto l'inibizione di questa, da parte della nevirapina, ne induce il silenziamento. La mancata espressione di questi geni è la causa dell'arresto della proliferazione e dell'innescio del processo differenziativo delle cellule F9.

Sulla base dei risultati riassunti sopra si desume che:

- la RT endogena ha un ruolo nel processo di trasformazione tumorale e, conseguentemente, nel controllo della proliferazione cellulare,
- la nevirapina inibisce l'attività RT endogena delle cellule F9,
- l'inibizione della RT blocca la crescita tumorale e favorisce la conversione delle cellule di teratocarcinoma F9 ad un fenotipo normale.

A livello molecolare, questo processo è mediato dal silenziamento dei geni della Ciclina D1 e D2 da parte della nevirapina. Pertanto se ne conclude che i composti che mostrano attività di inibizione della RT, come ad esempio la nevirapina, possono essere utilizzati come farmaci antiproliferativi.

Le diazepine dell'invenzione, e la nevirapina in particolare, compresi i loro sali e/o derivati farmaceuticamente accettabili, possono essere somministrate nelle forme farmaceutiche comunemente già usate e quindi in combinazione con i comuni carriers e/o diluenti e/o solventi e/o eccipienti già utilizzati a questo scopo. La nevirapina, ad esempio può essere in forma di compresse comprendenti da 2,5 a 200 mg di nevirapina, oppure sospensioni comprendenti da 5 a 10 mg/ml di nevirapina, oppure soluzioni intravenose contenenti circa 0,8 mg/ml di nevirapina, unitamente ad un co-solvente adatto a solubilizzare la nevirapina. Le dosi normalmente somministrate a fini terapeutici sono quelle note.

LGR

RM 2001 A 000767A

RIVENDICAZIONI

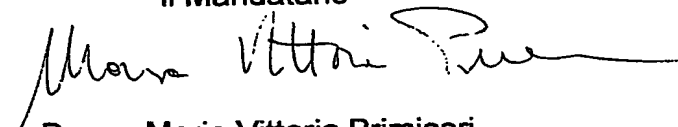
1. Uso di composti inibitori della trascrittasi inversa per la preparazione di composizioni farmaceutiche che arrestano la progressione di cellule tumorali e riconvertono le cellule trasformate in cellule fenotipicamente normali.
2. Uso secondo la riv. 1 in cui i composti sono scelti nella classe delle 5,11-diidro-6H-dipirido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepine.
3. Uso delle 5,11-diidro-6H-dipirido[3,2-b:2',3'-e][1,4]diazepine per la preparazione di composizioni farmaceutiche ad attività antiproliferativa.
4. Uso della nevirapina, compresi i suoi sali e/o derivati farmaceuticamente accettabili, per la preparazione di composizioni farmaceutiche ad attività antiproliferativa.
5. Uso secondo la rivendicazione 4 in cui la composizione farmaceutica comprende nevirapina, carrierse/o diluenti e/o solventi e/o eccipienti per la preparazione di composizioni per uso orale, o intravenoso.
6. Uso secondo la rivendicazione 4 in cui la composizioni farmaceutica è in forma di compresse, sospensioni o soluzioni.

Roma, 24 Dicembre 2001

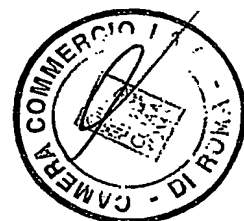
PV

p. Corrado SPADAFORA e Rodolfo Nello LORENZINI

Il Mandatario


Dr.ssa Maria Vittoria Primiceri

della NOTARBARTOLO & GERVASI SpA



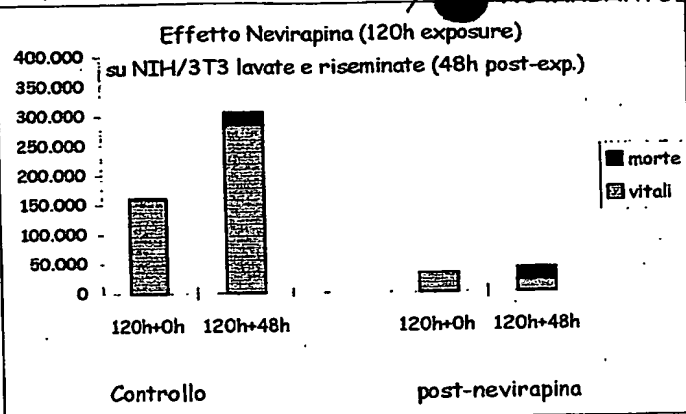
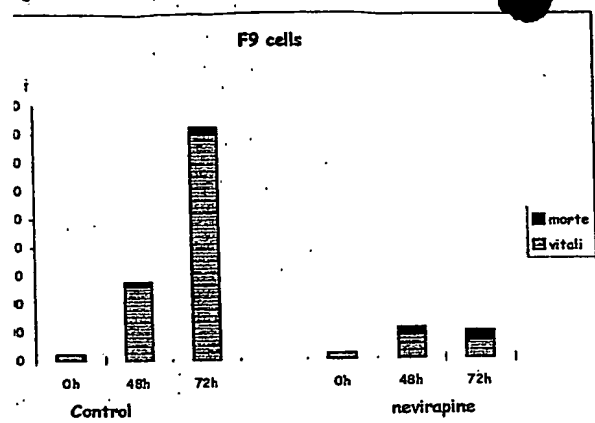


Figura 1

RM 2001 A 000707

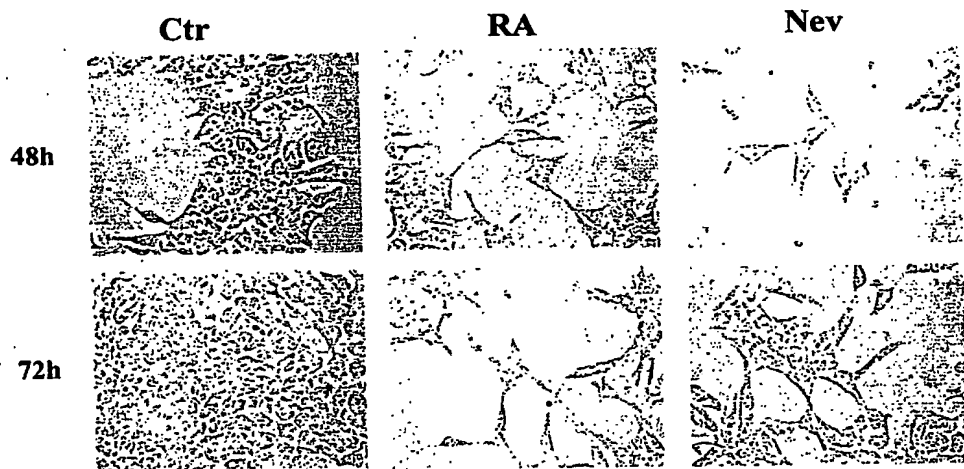


Figura 3

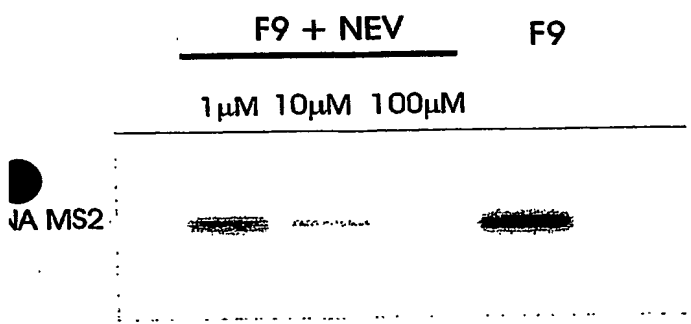


Figura 4

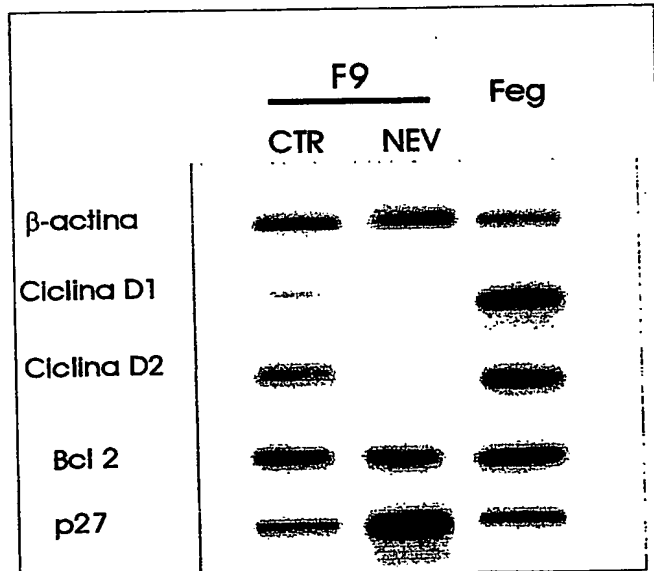


Figura 5